TOLERANZINDUKTION BEI IMMUNISIERTEN KANINCHEN DURCH ENTERALE APPLIKATION VON PEPSINGESPALTENEM HUMANEM GAMMAGLOBULIN

Klaus Hallfeldt

Diss. München
1984

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der
Universität München, Klinikum Großhadern
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Brendel

TOLERANZINDUKTION BEI IMMUNISIERTEN KANINCHEN DURCH ENTERALE APPLIKATION VON PEPSINGESPALTENEM HUMANEM GAMMAGLOBULIN

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Klaus Hallfeldt
aus München
1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr. J. Seifert
Mitberichterstatter: Prof.Dr.Dr.h.c. W. Brendel
Dekan: Prof.Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 26.4.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.med.Dr.med.h.c. W. Brendel, der es mir ermöglichte, in dem von ihm geleiteten Institut für Chirurgische Forschung die Untersuchungen durchzuführen.
Danken möchte ich vor allem auch Herrn Professor Dr.med. J. Seifert für seine Hilfsbereitschaft, seine Geduld und die stets freundliche Anleitung und Beratung.
Frau J. Krumbach, Frau A. Pfleiderer und Frau R. Ganser danke ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie für die Übernahme eines großen Teils der labortechnischen Arbeiten.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544311_0070

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	4
2.1.	Versuchstiere	4
2.2.	Versuchsablauf	4
2.2.1.	Immunisierung der Kaninchen gegen humanes Gammaglobulin (HGG)	4
2.2.2.	Aufteilung der Versuchstiere in verschiedene Gruppen	4
2.2.3.	Enterale Applikation von gespaltenem HGG vor der intravenösen Antigenexposition	5
2.2.4.	Intravenöse Antigenexposition der Kaninchen mit HGG	5
2.2.5.	Messung der Organdurchblutung	7
2.2.6.	Histologische Untersuchungen	8
2.2.7.	Blutentnahmen zur Bestimmung von verschiedenen Serumparametern	8
2.3.	Methoden	8
2.3.1.	Agargel-Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony	8
2.3.2.	Spaltung von Humanem Gammaglobulin mit Pepsin	10
2.3.3.	Markierung von HGG mit 125-Jod und Trennung des markierten Proteins von dem ungebundenen Indikator	10
2.3.4.	Radioimmunoassay (RIA)	11
2.3.5.	Histaminbestimmung	12
2.3.6.	Bestimmung des C_3-Komplementfaktors	12
2.3.7.	Statistische Auswertung	13
3.	Ergebnisse	14

3.1.	Mortalitätsrate nach intravenöser Applikation von humanem Gammaglobulin	14
3.2.	Veränderung des arteriellen Drucks nach intravenöser Applikation von humanem Gammaglobulin	14
3.3.	Ergebnisse der Durchblutungsmessung	17
3.4.	Organverteilung von 125-Jod markiertem humanem Gammaglobulin nach intravenöser Applikation	21
3.5.	Änderungen des Serumspiegels der spezifischen Antikörper gegen HGG während des Versuchs Ergebnisse des Radioimmunoassays	24
3.6.	Ergebnisse der Histaminbestimmung. Änderung des Histaminspiegels im Blut während des Versuchs	24
3.7.	Änderungen des C_3-Komplementspiegels im Serum während des Versuchs	27
3.8.	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen	30
4.	Diskussion	35
4.1.	Resorption großmolekularer Proteine aus dem Magen-Darmtrakt und Möglichkeiten der Blockierung von Antikörpern durch Haptene	36
4.2.	Wege der oralen Toleranzinduktion und als Erklärung zur Diskussion stehende immunologische Mechanismen	38
4.3.	Modelle zur Erklärung kurzfristig eintretender Änderungen der Immunitätslage bei immunisierten Versuchstieren nach enteraler Applikation des Antigens	41
4.3.1.	Änderungen der Anzahl freier spezifischer Antikörper im Serum, des Bluthistaminspiegels und des C_3-Komplementfaktors im Serum	42
4.3.2.	Veränderungen in den Peyerschen Plaques nach enteraler Antigenapplikation	44
5.	Zusammenfassung	48

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß durch die enterale Applikation eines Antigens nicht nur Immunität, sondern auch Toleranz erzeugt werden kann. 1911 entdeckten WELLS und OSBORNE (51,52), daß Meerschweinchen, die mit Mais gefüttert werden, eine immunologische Toleranz gegen Zein, ein im Mais enthaltenes Protein entwickelten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam CHASE 1946 (11). Er beobachtete, daß die normalerweise nach intracutanen Injektionen eintretende Sensibilisierung von Meerschweinchen gegen Dinitrochlorobenzol verhindert werden konnte, wenn den Tieren das Antigen vorher mehrmals enteral verabreicht worden war. Vor allem in den letzten Jahren erschienen weitere Veröffentlichungen auf diesem Gebiet, die die Ergebnisse der alten Untersuchungen bestätigen, unter anderem Arbeiten von THOMAS und PARROT (45) die in Ratten eine Toleranz gegen bovines Serumalbumin erzeugten und von ANDRÉ und HEREMANS (1), die entdeckten, daß Mäuse eine Hyposensibilität gegen oral zugeführte Schaferythrozyten entwickeln können. Die Mechanismen, die dieser enteral induzierten Toleranz zugrunde liegen, sind nicht genau bekannt, und die Meinungen der einzelnen Autoren darüber weisen große Unterschiede auf. ANDRÉ und HEREMANS (1,3) gehen davon aus, daß im Serum zirkulierende Antigen-IgA-Komplexe für die Erzeugung einer Hyposensibilität von großer Bedeutung sind, während KAGNOFF (21,22,23) der Ansicht ist, daß ein humoraler Faktor die Toleranz vermittelt. Andere Autoren (27) wiederum glauben, daß Suppressor T- oder B-Zellen eine wichtige Rolle spielen.

Einen wichtigen Ansatzpunkt zur Klärung der immunologischen Mechanismen im Magen-Darm-Trakt dürften neuere Untersuchungen über die Resorption von Proteinen aus dem Darm darstellen. Es ist seit langem bekannt, daß Neugeborene in der Lage sind, großmolekulare Proteine, z.B. Gammaglobuline, vollständig und intakt zu resorbieren. Im erwachsenen Organismus hingegen werden nach heute immer noch gängiger Meinung die Proteine im Darm zu Aminosäuren gespalten und ausschließlich in dieser Form vom Körper aufgenommen. Diese Auffassung konnte durch neue Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden.

WALKER et al (46,47) berichteten 1972, daß Meerrettichperoxidase die Darmwand passieren kann, ohne dabei ihre chemischen und biologischen Eigenschaften zu verlieren. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen THOMAS und PARROT (45), die Albumin verwendeten. SEIFERT (40) konnte zeigen, daß 5 - 20 % des von ihm benutzten Antilymphozytenserums die Darmwand in intakter großmolekularer Form passieren. Dieser Sachverhalt ist von großer immunologischer Bedeutung und sollte in zukünftigen Untersuchungen Berücksichtigung finden.

Ein interessanter Aspekt im Hinblick auf eine enterale Toleranzinduktion ergibt sich, wenn man diese neuen Erkenntnisse über die Resorption von Proteinen mit Untersuchungen über die Möglichkeit einer sog. Haptenhemmung in Verbindung bringt. 1972 konnte DE WECK (14,15) am Beispiel des Penicillins zeigen, daß eine hyperergische Reaktion auf ein Antigen durch die gleichzeitige Gabe eines dem Antigen in seiner Antikörperspezifität ähnlichen Haptens verhindert werden kann. Gegen Penicillin allergische Versuchspersonen konnten unter dem Schutz von Benzylpenicilloylformyllysin, einem dem Penicillin nahestehenden monovalenten Hapten, ohne große Probleme einer Penicillintherapie unterzogen werden. Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen von HEDIN, RICHTER und MESSMER (26,28,29,34,35) bestätigt, die in Tierexperimenten zeigten, daß hyperergische Reaktionen auf Dextran durch die vorherige oder gleichzeitige Gabe eines entsprechenden monovalenten Haptens verhindert oder bedeutend abgeschwächt werden können.

Berücksichtigt man die eben beschriebenen Untersuchungsergebnisse, so stellt sich die Frage, ob es auch möglich ist, eine Haptenhemmung zu erreichen, wenn das Hapten nicht parenteral, sondern enteral appliziert wird. Diese Überlegung war der Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit. Folgende Fragen sollten behandelt werden:

1. Läßt sich durch die enterale Applikation eines mit Pepsin gespaltenen Antigens in

einem sensibilisierten Organismus eine Toleranz gegen eine nachfolgende parenterale Antigenapplikation induzieren?

2. Durch welche Mechanismen wird eine mögliche Toleranzinduktion bewirkt?

Als Versuchstier wurde das Kaninchen und als Antigen humanes Gammaglobulin verwendet.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden Bastard-Kaninchen beiderlei Geschlechts mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 3,5 kg verwendet (bezogen von der Firma Riedel, Feldmoching). Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten und bekamen als Futter Altromin K-2023 (Altromin GmbH, Lager) und Wasser ad libitum.

2.2. Versuchsablauf

2.2.1. Immunisierung der Kaninchen gegen humanes Gammaglobulin (HGG)

Alle für die Versuche verwendeten Kaninchen wurden zunächst gegen humanes Gammaglobulin immunisiert. Dies geschah durch viermalige Gabe von je 50 mg (1 ml) humanem Gammaglobulin (Intraglobin, Biotest, Frankfurt) zusammen mit 1 ml Komplettem Freudschem Adjuvans (DIFCO Laboratories, Detroit, USA), in Abständen von drei bis vier Tagen, tief in den Glutealmuskel injiziert (Abb.1). Mit Hilfe des Agargeldoppeldiffusionstests nach Ouchterlony (32) wurde festgestellt, ob die Kaninchen präzipitierende Antikörper gegen HGG gebildet hatten (s. 2.3.1.).

2.2.2. Aufteilung der Versuchstiere in verschiedene Gruppen

Die immunisierten Kaninchen wurden in zwei Gruppen, eine Kontrollgruppe und eine sog. Versuchsgruppe aufgeteilt. Die Zuordnung geschah rein zufällig. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand darin, daß den Tieren der Versuchsgruppe, im Gegensatz zu den Tieren der Kontrollgruppe, 4 und 2 Stunden vor der intravenösen Gabe des Antigens pepsingespaltenes Antigen enteral appliziert wurde.

2.2.3. Enterale Applikation von gespaltenem HGG vor der intravenösen Antigenexposition

Die 20 zur Versuchsgruppe gehörigen Kaninchen wurden nach 24-stündiger Nüchternheit 4 und 2 Stunden vor der Antigenexposition durch eine Magensonde mit je 0,5 g pepsingespaltenem HGG zusammen mit je 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gefüttert (Abb.1). Die Tiere der Kontrollgruppe hingegen wurden nicht oral vorbehandelt.

2.2.4. Intravenöse Antigenexposition der Kaninchen mit HGG

Sowohl die Kontrolltiere, als auch die oral vorbehandelten Tiere der Versuchsgruppe bekamen intravenös 50 mg HGG.

Da während des Versuchs der arterielle Blutdruck und die Durchblutung gemessen werden sollten, war es erforderlich, die Kaninchen zu narkotisieren. Dies geschah mit Brevymital (Fa. Lilly), einem Kurzzeitbarbiturat, das in kleinen Mengen über eine Ohrvene zugeführt wurde. Nach eingeleiteter Narkose erfolgte die Freilegung und Katheterisierung der linken A. Carotis interna. Der Katheter wurde mit einem Statham-Druckaufnehmer (Statham-Element P 23 D) verbunden und an eine Hellige-Blutdruckmeßvorrichtung angeschlossen. Zur Gewinnung einer Referenzprobe für die Durchblutungsmessungen mußte noch ein zweiter arterieller Zugang geschaffen werden. Dies geschah durch Katheterisierung einer A. Femoralis.

Nach diesen Vorbereitungen und einem kurzen Erholungszeitraum konnten die Tiere der intravenösen Antigenexposition ausgesetzt werden. 50 mg HGG wurden langsam über einen Katheter in eine Ohrvene injiziert. Gerieten die Kaninchen als Folge der parenteralen Antigenexposition in einen Schockzustand, was sich durch einen starken Blutdruckabfall bemerkbar machte, so erhielten die Tiere 50 ml physiologische Kochsalzlösung intravenös verabreicht. Im Falle eines Atemstillstandes wurden Wiederbelebungsversuche unternommen. Der Blutdruck wurde fortlaufend über einen Zeitraum von mindestens 60 Minuten gemessen (Abb.1).

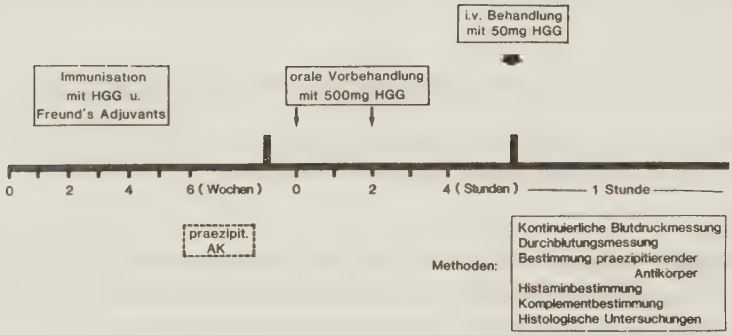

Abb.1 Schematische Darstellung der Versuchsanordnung

Bei 15 Tieren wurde 125-Jod markiertes HGG zur intravenösen Applikation verwendet, um Unterschiede in der Organverteilung des Antigens zwischen Kontroll- und Versuchstieren feststellen zu können.

2.2.5. Messung der Organdurchblutung

Bei 6 Kontrolltieren und 8 Tieren der Versuchsgruppe wurden 30 - 60 Minuten nach der intravenösen Antigenapplikation Durchblutungsmessungen vorgenommen. Dies geschah mit radioaktiven sphärischen Partikeln nach der 1967 von RUDOLPH und HEYMANN beschriebenen Methode (36).

Eine wesentliche Grundlage für die Berechnung der Organdurchblutung nach dieser Methode ist die Annahme einer linearen Beziehung zwischen Radioaktivität und Durchblutung. Dem entspricht die Überlegung, daß der Fluß in der Aorta genauso groß ist wie die Summe der Flüsse aller Arterien, die von der Aorta abgehen. Die Zahl der sphärischen Partikel, oder anders ausgedrückt, die gemessene Radioaktivität in den verschiedenen Teilen des arteriellen Systems wäre dann direkt proportional dem Fluß. Die Errechnung der absoluten Durchblutung aus der Radioaktivität einer Region erfolgt durch den Vergleich mit der Radioaktivität einer anderen Region, deren Fluß bekannt ist. Dieses Vorgehen entspricht dem Prinzip der Referenzfluß-Methode. Die Referenzgröße läßt sich durch Entnahme einer definierten Menge Blut aus einer peripheren Arterie gleichzeitig zur intracardialen Injektion der Partikel bestimmen. Die Radioaktivität eines Organs kann dann wie folgt errechnet werden:

$$\text{Gewebsdurchblutung } \left(\frac{\text{ml}}{\text{g} \times \text{min}}\right) = \frac{\text{Gewebsradioaktivität (cpm)} \times \text{Referenzfluß } \left(\frac{\text{ml}}{\text{g} \times \text{min}}\right)}{\text{Referenzradioaktivität (cpm)}}$$

Um die Durchblutung nach der oben beschriebenen Methode bestimmen zu können, wurden den Kaninchen etwa 800 000 ^{85}Sr oder ^{91}Nb markierte Tracer-Sephadex-Partikel, in 3 ml Ficoll-Lösung sus-

pendiert, über einen Zeitraum von 30 Sek. in die linke A. Carotis interna injiziert. Die arterielle Referenzprobe wurde zur gleichen Zeit aus einer A. Femoralis entnommen. Im Anschluß daran war es erforderlich, die Versuchstiere zu töten, um die für die Durchblutungsmessung relevanten Organe entnehmen zu können.

2.2.6. Histologische Untersuchungen

Sowohl einigen Kontrolltieren, als auch Tieren der Versuchsgruppe wurden 30 - 60 Minuten nach der intravenösen Antigenexposition mehrere Peyersche Plaques aus verschiedenen Abschnitten des Dünndarms entnommen. Die in Glutaraldehyd konservierten Präparate wurden von Herrn Professor Liebich von der Tiermedizinischen Fakultät der Universität München licht- und elektronenoptisch untersucht.

2.2.7. Blutentnahme zur Bestimmung von verschiedenen Serumparametern

Sowohl den Tieren der Versuchsgruppe, als auch den Kontrolltieren wurden zu definierten Zeiten Blutproben entnommen, um eine Histaminbestimmung, eine Bestimmung des C_3-Komplementfaktors und einen Radioimmunoassay durchführen zu können. Die zeitliche Aufeinanderfolge der einzelnen Blutentnahmen kann Tabelle 1 entnommen werden.

2.3. Methoden

2.3.1. Agargel-Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony

Zunächst war es erforderlich Agar in einer 1,5 %igen und in einer 2 %igen Konzentration herzustellen. Zu diesem Zweck wurden 2,25 g Agar purum (Fa. Behringwerke, Marburg) in 50 ml Michaelispuffer und 100 ml Aqua dest. und 0,6 g Agar purum in 10 ml Michaelispuffer und 20 ml Aqua dest. zum Quellen gebracht.

KONTROLLGRUPPE

1. Blutentnahme: Unmittelbar vor der i.v. Antigenapplikation
2. Blutentnahme: 30 Min. nach der i.v. Antigenapplikation

VERSUCHSGRUPPE

1. Blutentnahme: Vor der 1. oralen Gabe von HGG
2. Blutentnahme: 1 Stunde nach der 1. oralen Gabe von HGG
3. Blutentnahme: Vor der 2. oralen Gabe von HGG
   (2 Stunden nach Versuchsbeginn)
4. Blutentnahme: Unmittelbar vor der i.v. Antigenapplikation
5. Blutentnahme: 30 Min. nach der i.v. Antigenapplikation

Tab.1 Zeitliche Aufeinanderfolge der Blutentnahmen während des Versuchs

Da das Quellen mehrere Stunden in Anspruch nahm, konnten die Ansätze meistens erst am darauffolgenden Tag weiterverarbeitet werden. Als nächstes wurden die beiden Ansätze im Wasserbad für kurze Zeit zum Kochen gebracht und anschließend auf ca. 80°C abgekühlt. Der 2 %ige Agar wurde als dünner Film auf zuvor gereinigte Objektträger aufgetragen. Nach erfolgter Trocknung kam auf diesen Film eine zweite Schicht, bestehend aus 3 ml 1,5 %igem Agar. Nach dem Erkalten ließen sich leicht die erforderlichen Löcher ausstanzen. Um ein mittleres Loch von 6 mm Durchmesser wurden jeweils 6 kleinere Löcher mit einem Durchmesser von 2 mm ringförmig angeordnet. Das mittlere Loch nahm das Antiserum auf, die 6 kleinen Löcher das Antigen. Die so beschickten Objektträger wurden in feuchten Kammern aufbewahrt und nach zwei bis drei Tagen auf Präzipitate hin untersucht.

2.3.2. Spaltung von humanem Gammaglobulin mit Pepsin

Nach erfolgter Dialyse gegen 0,1 n Natriumacetat wurde die das humane Gammaglobulin enthaltende Lösung auf einen pH von 4,5 eingestellt und mit Pepsin im Verhältnis 1 : 50 (w/w) versetzt. Dieses Gemisch mußte mindestens 12 Stunden inkubieren. Nach beendeter Inkubation wurde das Gemisch zentrifugiert und der Überstand auf einen pH von 7,4 eingestellt. Abschließend war es erforderlich, den Überstand gegen phosphatgepufferte physiologische NaCl-Lösung dialysieren zu lassen.

2.3.3. Markierung von HGG mit 131-Jod und Trennung des markierten Proteins von dem ungebundenen Indikator

Dies geschah nach der Methode von FRANKS, TAKEDA und REEVE (17). Das mit einem Glycinegemisch im Verhältnis 2 : 1 gepufferte HGG wurde in eine auf 0°C gekühlte Glaskammer gegeben. Als nächstes wurden 100 in Natriumthiosulfatlösung gepuffertes Na-131-J mit einer spezifischen Aktivität von 5 - 20 Ci/mg 131-J (Fa. Buchler, Amersham, Braunschweig) mit 0,9 % NaCl-Lösung auf das Volumen von 1 ml verdünnt, mit 4

Tropfen einer 1n HCl-Lösung versetzt, anschließend auf 40°C erhitzt und dann sofort wieder abgekühlt. Nach Erreichen einer Temperatur von ca. 4°C wurde tropfenweise solange ein inaktiver Natrium-Jodid/Jodat-Puffer (50 mg NaJ + 200 mg $NaJO_3$) hinzugefügt, bis durch Oxydation graubraunes Jod entstanden war. Dieses Gemisch wurde zu dem gepufferten Protein in die Glaskammer geschüttet. Nach erfolgreicher Markierung entstand ein violetter Ring, der durch intensives Rühren zum Verschwinden gebracht werden konnte, so daß das Protein wieder die ursprüngliche Farbe annahm. Der Farbwechsel zeigte an, daß sich das radioaktive Jod an die Doppelbindungen der Tyrosinringe des Proteins gebunden hatte. Abschließend wurde das Gemisch noch einmal mit vier Tropfen einer 0,1 n HCl-Lösung versetzt. Da nicht die gesamte Menge des radioaktiven Jods an das Protein gebunden werden konnte, mußte das freie 131-Jod durch eine Gelchromatographie mit einer Sephadex-Säule (Sephadex G-200 bzw. G-25, Fa. Pharmacia, Schweden) von dem gebundenen 131-Jod getrennt werden. Mit dieser Methode ließ sich die Trennung ohne Schwierigkeiten durchführen, da beide Substanzen in ihrem Molekulargewicht stark differieren. Durch eine anschließend ausgeführte Proteinfällung mit 10 %iger Trichloressigsäure oder 3 %iger Perchlorsäure konnte gezeigt werden, daß der Anteil der fällbaren Radioaktivität bei über 99 % der Gesamtaktivität lag. Nochmals vorgenommene chromatographische Trennungen bestätigten diese Ergebnisse. Die Herstellung des für die Versuche verwendeten markierten Proteins lag nie länger als 2 Tage zurück.

2.3.4. Radioimmunoassay (RIA)

Die Methode basiert auf dem Wettbewerb radioaktiv markierter und unmarkierter Antikörper um ein für sie spezifisches Antigen. Nach dem Prinzip der Isotopenverdünnung ist die gebundene Radioaktivität umgekehrt proportional der Menge der im zu untersuchenden Serum enthaltenen Antikörper.

Ziel des hier durchgeführten Radioimmunoassay war die quantitative Bestimmung HGG-spezifischer Antikörper im Serum

der Versuchstiere. Dazu wurden 1000 µl des an eine feste Phase (Sepharose) adsorbierten Antigens (HGG, Intraglobin, Fa. Biotest) mit 125 µl eines 125-Jod markierten Anti HGG-Serums und 250 µl des zu untersuchenden Serums inkubiert. Die Markierung der Antikörper erfolgte nach der von FRANKS, TAKEDA und REEVE beschriebenen Methode (17). Aufgrund der Bindung des humanen Gammaglobulins an Sepharose und der damit verbundenen Erhöhung des spezifischen Gewichts, war nach Beendigung der 15-stündigen Inkubationszeit die Trennung der entstandenen Immunkomplexe von den verbliebenen ungebundenen Antikörpern durch Zentrifugieren problemlos möglich. Danach wurde das Zentrifugat dreimal in einer Pufferlösung gewaschen und anschließend die Radioaktivität mit einem Gammascintillationspektrometer (Fa. Packard) gemessen. Die Auswertung erfolgte nach der Kurvenanpassungsmethode der linearen Regression.

2.3.5. Histaminbestimmung

Der Nachweis des Histamins erfolgte durch eine Kondensationsreaktion mit o-Phthaldialdehyd zu einem fluoreszierenden Farbstoff, wobei die gemessene Intensität der Fluoreszenz der Konzentration des Histamins proportional war. Nachdem das den Kaninchen entnommene Blut mit Aqua dest. im Verhältnis 1 : 1 verdünnt worden war, wurden die korpuskulären Bestandteile durch Ultraschall zerstört, dieses Blut zentrifugiert, das Sediment verworfen und anschließend der Überstand mit 70 %iger Perchlorsäure im Verhältnis 10 : 1 versetzt, um das vorhandene Eiweiß zu eliminieren. Mit dem nach erneuter Zentrifugation erhaltenen Überstand konnte nun die Kondensationsreaktion durchgeführt werden, für die ein Autoanalyzer (Autoanalyzer II, Fa. Technicon) verwendet wurde.

2.3.6. Bestimmung des C_3-Komplementfaktors

Die quantitative Bestimmung des C_3-Komplementfaktors erfolgte mit Hilfe der Methode nach MANCICI. Mit 2 %iger Agarlösung bestrichene Glasplatten und gut entfettete, als Deckplatten

dienende Glasplatten wurden durch Plexiglasleisten und Klammern so zueinander fixiert, daß die Zwischenräume mit ca. 15 ml Agarlösung gefüllt werden konnten. Die für die Füllung verwendete 1,5 %ige Agarlösung beinhaltete 10 % Antiserum gegen den C_3-Komplementfaktor. Nach Erkalten des Agars konnten die Deckplatten vorsichtig abgezogen und anschließend mit einer Schablone fünf Reihen mit jeweils 6 Löchern in das Gel gestanzt werden. Eine Reihe jeder Platte wurde mit einem Kontrollserum in den Verdünnungen 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 und 1 : 10 gefüllt, die verbleibenden Löcher waren den Testseren vorbehalten. In den so beschickten Platten entwickelten sich nach mehrtägiger Aufbewahrung in feuchten Kammern um die Löcher Präzipitationshöfe, die nach Trocknung und Färbung des Gels ausgemessen werden konnten. Errechnet wurden die prozentualen Verhältnisse der Werte der Testseren zu den in einer Kurve aufgetragenen Werten der Verdünnungsreihe.

2.3.7. Statistische Auswertung

Es wurden Mittelwert, Standardabweichung und mittlere Fehler des Mittelwertes berechnet. Signifikante Unterschiede zweier zu vergleichender Gruppen wurden mit dem Wilcoxon Test gesichert.

3. Ergebnisse

3.1. Mortalitätsrate nach intravenöser Applikation von humanem Gammaglobulin

Sechs der 13 Kontrolltiere erlitten in den ersten 15 Minuten nach der intravenösen Antigenexposition einen Atem- und Herzstillstand. Drei dieser sechs Tiere konnten wiederbelebt werden und überlebten bis zum Ende des Versuchs. Von den ebenfalls 13 Tieren der Versuchsgruppe trat in der oben genannten Zeit bei zwei Tieren ein Atem- und Herzstillstand auf, in dessen Folge ein Tier starb. Daraus resultiert eine Mortalitätsrate von 23 % bei den Kontrolltieren im Vergleich zu 8 % bei den Tieren der Versuchsgruppe.

3.2. Veränderungen des arteriellen Drucks nach intravenöser Applikation von humanem Gammaglobulin

Bei allen zu den Versuchen herangezogenen Tieren wurde während des Versuchs kontinuierlich der arterielle Mitteldruck gemessen. Dies geschah aus der Überlegung heraus, daß das Ausmaß einer Kreislaufdestabilisierung nach intravenöser Gabe des Antigens die Stärke der sich im Organismus abspielenden Immunreaktionen widerspiegelt.
Die durchschnittlichen Änderungen des arteriellen Drucks der Tiere beider Versuchsgruppen nach intravenöser Gabe des Antigens sind in Abb. 2 dargestellt.
Sowohl bei den Tieren der Kontrollgruppe, als auch bei den Versuchstieren kommt es schon eine Minute nach intravenöser Antigenapplikation zu einem hoch signifikanten Abfall des arteriellen Drucks ($p < 0{,}001$). Ca. 5 Minuten nach der intravenösen Antigenexposition haben die Druckwerte ihren niedrigsten Stand erreicht. Die folgenden 25 Minuten sind dann durch eine langsam eintretende Stabilisierung des Kreislaufs gekennzeichnet, der Druckanstieg in dieser Zeit ist jedoch in beiden Gruppen nicht signifikant. Alle Kaninchen zeigen eine ähnliche Reaktionsweise auf die intravenöse Applikation des Antigens, was aber das Ausmaß der Reaktion betrifft, so bestehen deutliche Unterschiede

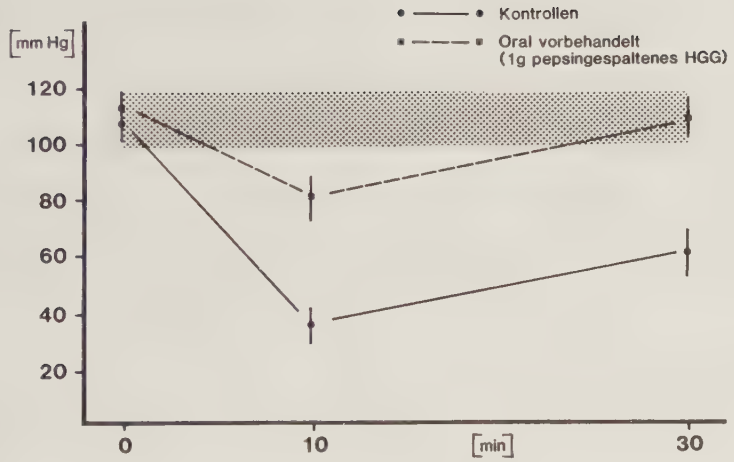

Abb.2 Durchschnittliche Änderungen des arteriellen Drucks der Tiere beider Versuchsgruppen nach intravenöser Gabe des Antigens

Kontrolltiere				Versuchstiere		
Zeit	Mittlerer art. Druck	Signifikanz	Signifik. zwischen beiden Gruppen	Signifikanz	Mittlerer art. Druck	Zeit
0	111 ± 5,13		← p = n.s. →		112 ± 5,42	0
1′	47 ± 6,60	p<0,001		p<0,001	78 ± 9,90	1′
2′	45 ± 7,30				76 ± 10,2	2′
5′	40,7 ± 6,35		← p < 0,01 →		74 ± 10,6	5′
10′	49 ± 8,10	p = n.s.		p = n.s.	82 ± 10,4	10′
15′	60 ± 8,63		← p < 0,025 →		89 ± 10,7	15′
30′	63 ± 11,3		← p < 0,025 →		95 ± 10,8	30′

Tab.2 Änderungen des arteriellen Drucks der Tiere beider Versuchsgruppen nach intravenöser Gabe des Antigens. Signifikanzverhältnisse.

zwischen den Kontrolltieren und den Tieren der Versuchsgruppe. Schon eine Minute nach der intravenösen Antigenexposition weist die Versuchsgruppe einen gegenüber der Kontrollgruppe signifikanten geringeren Blutdruckabfall auf ($p < 0,01$). Dieser signifikante Druckunterschied zwischen den beiden Gruppen bleibt bis zum Ende des Versuchs bestehen (nach 30 Min. $p < 0,025$).
In Tab. 2 sind die statistisch gesicherten Unterschiede noch einmal zusammenfassend dargestellt.

3.3. Ergebnisse der Durchblutungsmessung

Um ausgelöst durch den Blutdruckabfall auftretende Umverteilungen des zirkulierenden Blutvolumens beobachten zu können, wurden bei 14 Kaninchen Durchblutungsmessungen durchgeführt. Von besonderem Interesse waren dabei Änderungen der Durchblutung im Gastrointestinaltrakt.

Aus Tab. 3 sind die Ergebnisse der Messungen im Darm zu ersehen. In allen vier Teilabschnitten Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon fand sich bei den Tieren der Versuchsgruppe im Gegensatz zu den Kontrolltieren eine vermehrte Durchblutung. Die Untersuchung des Magens führte zu dem gleichen Ergebnis. Auch hier ließ sich bei den enteral vorbehandelten Tieren in den beiden Untersuchungsabschnitten Corpus-Fundus und Antrum eine sowohl in der Muscularis als auch in der Mucosa gesteigerte Durchblutung feststellen (Tab.4). Die Ergebnisse der Messungen in Lunge, Niere, Leber, Milz und Muskel sind aus Tab.5 zu ersehen. Auch in diesen Organen konnten bei den Tieren der Versuchsgruppe ausnahmslos höhere Durchblutungswerte festgestellt werden.

Einschränkend muß gesagt werden, daß die ermittelten Unterschiede nicht signifikant sind. Dies wird schon aus den hohen Standardabweichungen der Mittelwerte ersichtlich. Die Tatsache jedoch, daß ohne Ausnahme sämtliche Werte der enteral vorbehandelten Kaninchen höher liegen, läßt bei diesen Tieren eine gegenüber den Kontrolltieren vermehrte Organdurchblutung, vor allem auch im Gastrointestinaltrakt, als sehr wahrscheinlich erscheinen.

DARMDURCHBLUTUNG (ml / g x min.)

Kontrolltiere			Versuchstiere	
$\bar{x}$	$s\bar{x}$		$\bar{x}$	$s\bar{x}$
0,65	0,35	Duodenum	1,0	1,0
0,59	0,53	Jejunum	0,73	0,51
0,40	0,23	Ileum	0,44	0,42
0,50	0,48	Colon	0,58	0,48

Tab.3 Ergebnisse der Durchblutungsmessungen in verschiedenen Abschnitten des Darms

MAGENDURCHBLUTUNG (ml / g x min.)

Kontrolltiere			Versuchstiere	
$\bar{x}$	$s\bar{x}$		$\bar{x}$	$s\bar{x}$
0,22	0,11	Antrum Gesamtwand	0,47	0,45
0,19	0,20	Antrum Mucosa	0,88	0,92
0,15	0,16	Antrum Muscularis	0,19	0,27
0,38	0,18	Fundus-Corpus Gesamtwand	0,82	0,44
0,54	0,23	Fundus-Corpus Mucosa	0,94	0,54
0,11	0,11	Fundus-Corpus Muscularis	0,24	0,47

Tab.4 Ergebnisse der Durchblutungsmessungen in verschiedenen Abschnitten und Schichten des Magens

ORGANDURCHBLUTUNG (ml / g x min.)

Kontrolltiere			Versuchstiere	
$\bar{x}$	$s\bar{x}$		$\bar{x}$	$s\bar{x}$
4,44	6,32	Lunge	4,74	5,38
3,46	2,81	Niere	4,25	2,17
0,18	0,16	Leber	0,19	0,14
1,63	2,0	Milz	2,0	1,70
0,90	2,0	Muskel	1,0	1,20

Tab.5 Ergebnisse der Durchblutungsmessungen in Lunge, Niere, Leber, Milz und Muskel

3.4. Organverteilung von 125-Jod markiertem humanem Gammaglobulin nach intravenöser Applikation

Um eventuelle Besonderheiten in der Organverteilung des intravenös gegebenen humanem Gammaglobulins aufzufinden, wurde 15 Kaninchen 125-Jod markiertes Antigen appliziert. Ob das injizierte humane Gammaglobulin in dem Organismus nun eine Antigen-Antikörperbindung eingeht, ungebunden im Blut zirkuliert, von Phagozyten aufgenommen oder einfach metabolisiert wird, konnte auf diese Weise selbstverständlich nicht geklärt werden.

Das Ergebnis der Messungen ist aus den Tabellen 6 und 7 zu ersehen. Bei den dort aufgeführten Zahlen handelt es sich um die in 1 mg Gewebe gemessene Radioaktivität, ausgedrückt in Prozent und bezogen auf 1 ml Blut.

Wie Tab. 6 zeigt, liegen die für den Magen-Darmtrakt ermittelten Werte sehr dicht beieinander. Die Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen sind nicht signifikant. Dies gilt auch für die aufgeführten Teilabschnitte untereinander. Ähnlich wie bei dem Ergebnis der Durchblutungsmessung fällt jedoch auf, daß die Werte einer Gruppe, in diesem Fall der Kontrollgruppe, ausnahmslos höher liegen. Es wäre also durchaus in Betracht zu ziehen, daß die Kontrolltiere in einem stärkeren Maße als die Tiere der Versuchsgruppe intravenös gegebenes humanes Gammaglobulin im Magen-Darmtrakt anreichern.

Aus Tab.7 werden die Ergebnisse der Messungen in Lunge, Niere, Leber, Milz und Muskel ersichtlich. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind wiederum nicht signifikant. Aber auch in diesen Organen konnten bei den Kontrolltieren ausnahmslos höhere Werte festgestellt werden. Auffallend hoch ist die bei den Kontrolltieren in Lunge, Leber und Milz gemessene Radioaktivität. Diese Werte müssen jedoch sehr vorsichtig interpretiert werden, da deren Aussagefähigkeit durch die hohen Standardabweichungen der Mittelwerte eingeschränkt wird.

^{125}J - MARKIERTES ANTIGEN (i.v. HGG)

Kontrolltiere			Versuchstiere	
$\bar{x}$	$s\bar{x}$		$\bar{x}$	$s\bar{x}$
7	3	Antrum	2,5	0,4
14	7	Fundus-Corpus	5	0,9
13	15	Duodenum	5	1,3
11	5	Jejunum	3,8	0,5
15	8	Ileum	3,5	0,7
9	4	Colon	2,4	0,5

Tab.6 Organverteilung von 125-Jod markiertem humanem Gammaglobulin nach intravenöser Applikation in verschiedenen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts
(% Radioaktivität/mg Gewebe bezogen auf 1 ml Blut)

^{125}J - MARKIERTES ANTIGEN (i.v. HGG)

Kontrolltiere			Versuchstiere	
$\bar{x}$	$s\bar{x}$		$\bar{x}$	$s\bar{x}$
1659	1086	Lunge	166	142
60	29	Niere	31	11
1429	1179	Leber	153	70
1165	1067	Milz	95	48
5	1	Muskel	4	1

Tab.7 Organverteilung von 125-Jod markiertem humanem Gammaglobulin nach intravenöser Applikation in Lunge, Niere, Leber, Milz und Muskel.
(% Radioaktivität/mg Gewebe bezogen auf 1 ml Blut)

3.5. Änderungen des Serumspiegels der spezifischen Antikörper gegen HGG während des Versuchs. Ergebnisse des Radioimmunoassays

Um eine fundierte Interpretation des Kreislaufverhaltens der Kaninchen beider Gruppen zu ermöglichen, war es erforderlich, genauere Kenntnisse über die Art der immunologischen Vorgänge im Organismus der Tiere während des Versuchs zu erlangen. In diesem Zusammenhang galt das Interesse vor allem möglichen Änderungen der Anzahl der im Blut zirkulierenden spezifischen Antikörper gegen humanes Gammaglobulin. Diese quantitative Bestimmung der Antikörper gegen HGG wurde mit einem hoch spezifischen und sehr empfindlichen Radioimmunoassay durchgeführt.
Die Veränderungen in der Anzahl der frei im Blut zirkulierenden spezifischen Antikörper gegen HGG während des Versuchs sind in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt.
Bei den Tieren der Versuchsgruppe fällt der Antikörpertiter innerhalb einer Stunde nach der ersten oralen Antigenapplikation um über die Hälfte von 560 µg/ml auf 260 µg/ml ab. In der zweiten Stunde nach der ersten Fütterung kommt es zu einem Wiederanstieg dieses Wertes auf 330 µg/ml. Nach der zweiten oralen Antigenapplikation sinkt der Antikörpertiter auf einen Wert von 190 µg/ml. Dieses Absinken der Zahl der zirkulierenden spezifischen Antikörper ist beide Male signifikant. Nach der intravenösen Gabe des Antigens kommt es zu einem leichten Anstieg der Antikörper im Blut auf durchschnittlich 290 µg/ml.

Bei den Tieren der Kontrollgruppe bewirkt die intravenöse Antigenapplikation einen nicht signifikanten Abfall des Antikörpertiters von 530 µg/ml auf 480 µg/ml.

3.6. Ergebnisse der Histaminbestimmung. Änderungen des Histaminspiegels im Blut während des Versuchs

Der Grund für eine fortlaufende Bestimmung des Bluthistaminspiegels während des Versuchs war die Annahme, daß die Verän-

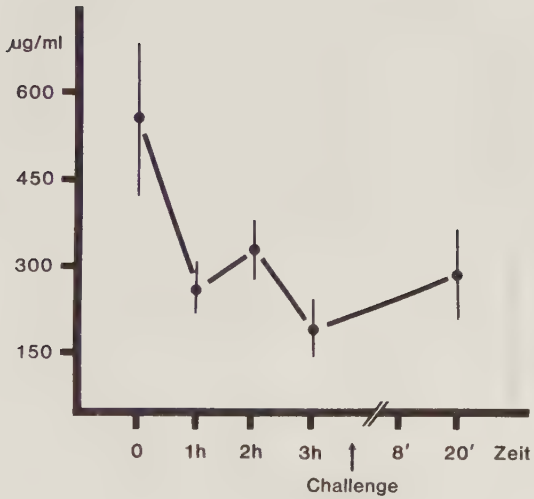

Abb.3 Änderungen des Serumspiegels der spezifischen Antikörper gegen HGG bei den Tieren der Versuchsgruppe während der Beobachtungszeit

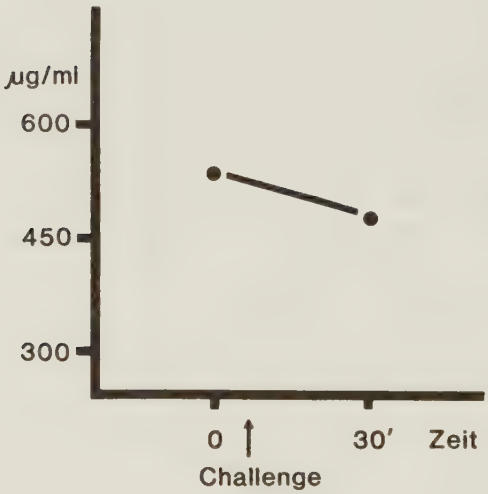

Abb.4 Änderungen des Serumspiegels der spezifischen Antikörper gegen HGG in den Kontrolltieren während der Beobachtungszeit

derungen der Kreislaufsituation nach der intravenösen Antigenapplikation Ausdruck einer sich im Kaninchenorganismus abspielenden anaphylaktoiden Reaktion sind. Von besonderem Interesse war die Frage, inwieweit orale Antigengaben den Histaminspiegel beeinflussen. Wie Abb. 5 verdeutlicht, kam es innerhalb von einer Stunde nach der ersten oralen Antigenapplikation zu einem signifikanten Anstieg des Bluthistaminspiegels von 380 ng/ml auf 510 ng/ml. In der zweiten Stunde nach der ersten Fütterung sank der Wert wieder auf 330 ng/ml ab, die dann folgende zweite Fütterung bewirkte eine nur geringgradige, nicht signifikante Erhöhung dieses Wertes. Nach der intravenösen Applikation des humanen Gammaglobulins kam es zu einem sofortigen signifikanten Abfall des Bluthistaminspiegels auf einen Wert von 100 ng/ml.

Auf die Bestimmung des Bluthistaminspiegels bei den Tieren der Kontrollgruppe wurde verzichtet, weil kaum anzunehmen ist, daß sich der Ausgangswert über einen Beobachtungszeitraum von 4 Stunden ändert.

3.7. Ergebnisse der C_3-Komplementbestimmung. Änderungen des C_3-Komplementspiegels im Serum während des Versuchs

Um zu zeigen, in welchem Maße sich das Komplementsystem an den Reaktionen des Organismus während des Versuchs beteiligt, wurden bei einem Teil der Tiere quantitative Bestimmungen des C_3-Komplementfaktors im Serum durchgeführt. Diese erfolgten nach der von MANCINI entwickelten Methode. Ausgewertet wurden die Durchmesser der entstandenen Präzipitationshöfe. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 dargestellt.

Eine Stunde nach der ersten enteralen Antigenapplikation kam es zu einem signifikanten Anstieg des C_3-Komplementfaktors im Serum, entsprechend einer durchschnittlichen Vergrößerung der Durchmesser der Präzipitationshöfe von 6,3 mm auf 6,8 mm. Die intravenöse Applikation des Antigens führte zu einem hochsignifikanten Abfall des C_3-Komplementspiegels im Serum, entsprechend einer Verkleinerung der Durchmesser der Präzipitationshöfe auf durchschnittlich 5,3 mm. Der im weiteren Verlauf innerhalb der ersten 30 Minuten nach der intra-

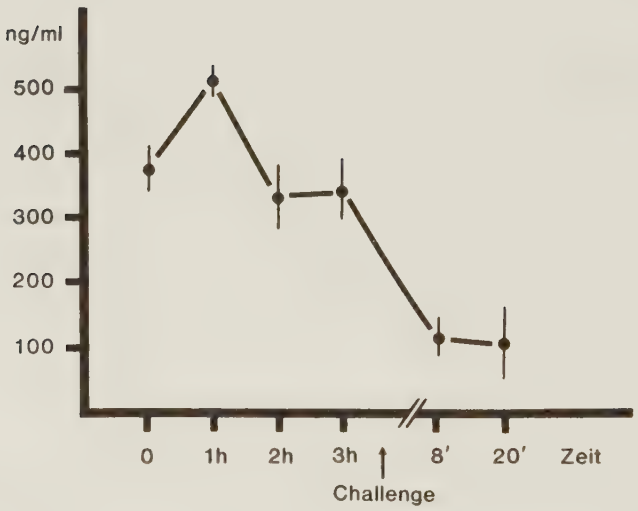

Abb.5 Änderungen des Bluthistaminspiegels bei den Tieren der Versuchsgruppe während der Beobachtungszeit

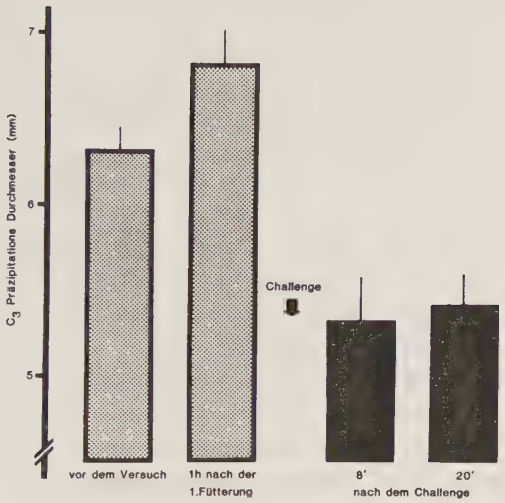

Abb.6 Änderungen des C_3-Komplementspiegels im Serum der Tiere der Versuchsgruppe während der Beobachtungszeit

venösen Antigenapplikation festgestellte Wiederanstieg des C_3-Komplementfaktors war nur gering und nicht signifikant.

Wie bei der Bestimmung des Bluthistaminspiegels wurde auch hier auf eine Kontrollgruppe verzichtet, da kaum anzunehmen ist, daß sich der Ausgangswert über einen Beobachtungszeitraum von 4 Stunden ändert.

3.8. Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Untersucht wurden Peyersche Plaques aus allen Abschnitten des Dünndarms.

Die Peyerschen Plaques von oral nicht vorbehandelten Tieren, also Tieren der Kontrollgruppe, waren histologisch unauffällig. Abb. 7 zeigt das Bild eines nicht veränderten Peyerschen Plaques eines Kontrolltieres. Zu erkennen sind mehrere submukös gelegene Follikel mit normalem Reaktionszentrum und Lymphozytenwall. In der Regel handelt es sich um 4 - 5 Follikel, die zu einem Plaque zusammengeschlossen sind. Die Darmzotten sind kaum lymphozytär infiltriert.

Im Gegensatz dazu zeigen die Peyerschen Plaques eines Kaninchens, das einer zweimaligen enteralen Applikation von humanem Gammaglobulin ausgesetzt wurde, eine sehr starke Zunahme der lymphoiden Zellen (Abb.8). Auch hier sind wieder mehrere submukös gelegene Follikel mit Reaktionszentrum und Lymphozytenwall zu erkennen. Auffallend ist jedoch eine massive Infiltration des Plaques mit lymphoiden Zellen, die auch auf die darüber liegenden Darmzotten übergreift. Diese verstärkten Ansammlungen von lymphoiden Zellen in den Peyerschen Plaques konnten nicht beobachtet werden, wenn den immunisierten Kaninchen eine nicht antigene Substanz oral verabreicht worden war. Sie sind nur charakteristisch für immunisierte Tiere, die einer enteralen Antigenapplikation ausgesetzt wurden.

Von besonderer Bedeutung dürfte sein, daß durch elektronenmikroskopische Aufnahmen in den Follikeln derart veränderter Plaques Plasmazellen nachgewiesen werden konnten. Abb. 9 zeigt eine solche Plasmazelle, deren Zellkern von einem breiten Saum endoplasmatischem Retikulums umgeben ist. Die

große Zahl von Ribosomen im endoplasmatischen Retikulum läßt darauf schließen, daß sich die Zelle in einem sekretorischen Zustand befindet, also Antikörper produziert. Es ist ungewöhnlich und bisher nicht beobachtet worden, daß in den Peyerschen Plaques reife Plasmazellen vorhanden sind. Normalerweise kann man nur die Vorläufer dieses Zelltyps in den Lymphfollikeln der Plaques finden, während die reifen Zellen in der restlichen Darmwand vorkommen. Möglicherweise ist die vorgelegte Beobachtung ganz spezifisch für den Versuch, das heißt, für immunisierte Kaninchen , denen das Antigen enteral appliziert wurde.

Abb.7 Peyerscher Plaque eines Kontrolltieres

Abb.8 Peyerscher Plaque eines immunisierten Kaninchens nach enteraler Applikation des Antigens

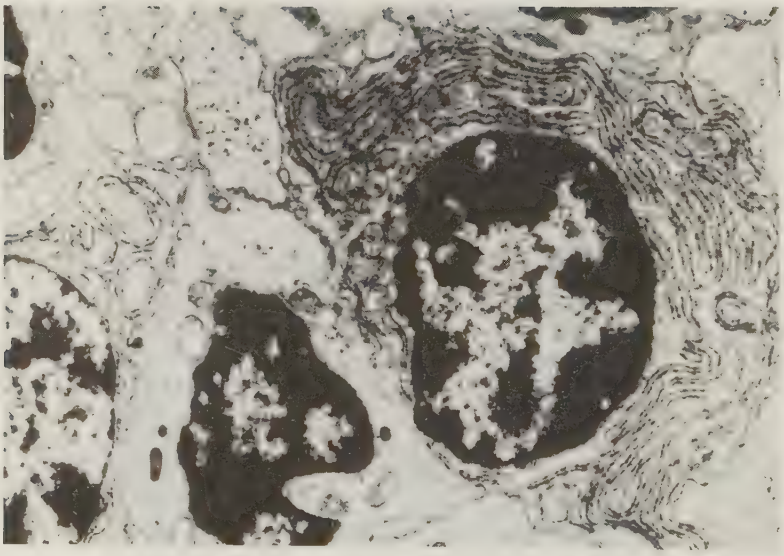

Abb.9 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Plasmazelle im Peyerschen Plaque eines immunisierten Kaninchens, das mit dem Antigen gefüttert wurde.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit die enterale Applikation eines Antigens kurzfristig die Immunitätslage in parenteral immunisierten Kaninchen verändert.

Die in diesem Rahmen durchgeführten Versuche zeigen sehr deutlich, daß die anaphylaktoiden Reaktionen des Organismus als Folge einer intravenösen Gabe von humanem Gammaglobulin durch die vorherige enterale Applikation dieses Antigens abgeschwächt oder sogar verhindert werden können.

Im folgenden soll diskutiert werden, welche Rolle der Gastrointestinaltrakt als immunologisch kompetentes Organ bei diesen Reaktionen spielt, inwieweit diese Versuche mit anderen Möglichkeiten der Toleranzinduktion in Verbindung gebracht werden können und nicht zuletzt, welche Mechanismen für die Änderung der Immunitätslage verantwortlich zu machen sind.

4.1. Resorption großmolekularer Proteine aus dem Magen-Darmtrakt und Möglichkeiten der Blockierung von Antikörpern durch Haptene

Wie bereits in der Einleitung gesagt wurde, kann die heute immer noch gängige Meinung, daß Proteine im Darm zu Aminosäuren gespalten und ausschließlich in dieser Form vom Körperkreislauf übernommen werden, vor allem durch neuere Untersuchungen nicht bestätigt werden. Schon 1927 konnte WALZER (55) zeigen, daß der menschliche Darm in der Lage ist, Proteine unter Beibehaltung der biologischen Aktivität zu resorbieren. Bei Versuchspersonen, die zuvor rohes Eiweiß gegessen hatten, ließen sich bereits wenige Minuten nach der Aufnahme an den Stellen subkutan injizierten Antiserums Antigen-Antikörper-Reaktionen vom Soforttyp beobachten. In einer 1972 veröffentlichten Arbeit berichteten WALKER et al (52), daß Meerrettichperoxidase die Darmwand passieren kann, ohne dabei ihre biologischen und chemischen Eigenschaften zu verlieren. Diese Untersuchungen wurden mit der 'everted-gut-sac'-Methode in vitro durchgeführt. 1974 gelang es SEIFERT (44) durch isotopentechnische und immunologische Methoden nachzuweisen, daß bei Hunden unter geeigneten Bedingungen 5 - 20 % des oral gegebenen Antilymphozytenglobulins die Darmwand in intakter großmolekularer Form passieren. Inzwischen gibt es eine große Zahl von Untersuchungen (3,46,51), die diese Ergebnisse bestätigen, im weiteren kann also davon ausgegangen werden, daß oral aufgenommene Proteine zu einem gewissen Prozentsatz als biologisch und chemisch unveränderte Großmoleküle im Blutkreislauf erscheinen.

Einschränkend muß jedoch gesagt werden, daß die Resorptionsrate von Proteinen aus dem Darm von der jeweiligen Immunitätslage des Organismus abhängig ist. WALKER et al (52,53) haben diesbezüglich Untersuchungen angestellt und kamen zu dem Ergebnis, daß sowohl eine enterale, als auch eine parenterale spezifische Immunisierung von Ratten mit Meerrettichperoxidase

bzw. bovinem Serumalbumin die Aufnahme dieser Stoffe in großmolekularer Form beeinträchtigt. Dabei ist von Bedeutung, daß die orale Immunisierung einen größeren negativen Effekt auf die Resorptionsrate ausübt, als dies bei der parenteralen Immunisierung der Fall ist. Die Ursache dieses Unterschieds dürfte auf eine vermehrte Bildung von sekretorischem IgA in der Darmwand als Antwort auf die orale Antigenapplikation zurückzuführen sein. Wie WALKER (54) zeigen konnte, ist das sekretorische IgA in der Lage, durch Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen im Darmlumen die Resorption des Proteins zu vermindern.

Die eben gemachten Aussagen über die Resorption großmolekularer Proteine aus dem Gastrointestinaltrakt sind für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen insofern von Bedeutung, als der Gedanke, im Blutkreislauf vorhandene spezifische Antikörper durch enteral verabreichtes Hapten zu blockieren, einen Ausgangspunkt der Experimente darstellte. Voraussetzung für diese Überlegung ist natürlich, daß eine ausreichende Menge intakten Haptens die Darmwand passieren kann.

Daß durch den Mechanismus der Haptenhemmung anaphylaktoide Kreislaufreaktionen als Folge einer intravenösen Antigenapplikation verhindert oder zumindest bedeutend abgeschwächt werden können, konnte, wie schon anfangs erwähnt, durch die Untersuchungen von DE WECK et al (17,18) am Penicillin und von HEDIN, RICHTER und MESSMER (34,35,40,41) am Dextran überzeugend dargelegt werden. Wie in vitro Versuche zeigten, ist die Blockierung der Antikörper durch das Hapten sehr effektiv. Nachfolgend hinzugegebenes Antigen vermag weder eine Präzipitations-, Hämagglutinations-, noch eine Komplementfixationsreaktion auszulösen (17).

Die Frage, inwieweit der Mechanismus der Haptenhemmung bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten für die Verhinderung der normalerweise nach intravenöser Applikation des Antigens eintretenden Kreislaufdestabilisierung

verantwortlich zu machen ist, kann mit den Ergebnissen der bisherigen Untersuchungen nicht zufriedenstellend beantwortet werden. Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Haptenen am Kreislaufgeschehen liefern Untersuchungen von FIGACZ (20), die sich von den uns durchgeführten Experimenten nur darin unterscheiden, daß anstelle des pepsingespaltenen humanen Gammaglobulins ungespaltenes Gammaglobulin oral verabreicht wurde. Auch diese Versuche führten zu dem Ergebnis, daß durch die vorherige orale Gabe des Antigens, in diesem Fall von ungespaltenem humanem Gammaglobulin, die sonst normalerweise nach intravenöser Antigenapplikation auftretenden Kreislaufreaktionen abgeschwächt werden können. Der Einfluß der oralen Antigenapplikation auf die Kreislaufsituation war hier jedoch erheblich geringer als bei den Tieren, die mit pepsingespaltenem HGG gefüttert wurden. Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, daß der Darm das vorgespaltene HGG sehr viel schneller in haptenförmige Bruchstücke zerlegen kann als das vollständige Molekül, und daß dadurch bei den mit pepsingespaltenem HGG vorbehandelten Tieren im gleichen Zeitraum wesentlich mehr Haptene in den Kreislauf gelangen als bei Tieren, die mit ungespaltenem HGG gefüttert wurden. Die daraus resultierende höhere Zahl blockierter Antikörper würde die geringere Reaktion auf die intravenöse Antigengabe erklären.

4.2. Wege der oralen Toleranzinduktion und als Erklärung zur Diskussion stehende immunologische Mechanismen

Um einen Überblick über die zum Teil sehr unterschiedlichen Vorstellungen von den immunologischen Vorgängen im Gastrointestinaltrakt zu schaffen, soll an dieser Stelle auf einige in der Literatur beschriebene Wege der enteralen Toleranzinduktion eingegangen werden.

Es ist seit langem bekannt, daß durch die enterale Applikation eines Antigens nicht nur Immunität, sondern auch

Toleranz erzeugt werden kann. Dieses, erstmalig 1911 durch WELLS und OSBORNE (57,58) beschriebene Phänomen konnte inzwischen durch eine Vielzahl von Untersuchungen belegt werden. Unklarheit herrscht nach wie vor über die genauen immunologischen Mechanismen, die diese Toleranz vermitteln.

1974 gelang es THOMAS und PARROT (51), bei Ratten auf oralem Wege eine Toleranz gegen Rinderserumalbumin zu erzeugen. Obwohl die Tiere zwei Wochen lang täglich mit 25 mg des Antigens gefüttert worden waren, ließen sich 20 Tage nach einer intramuskulären Antigenapplikation weder spezifische zirkulierende Antikörper, noch Antikörper-produzierende Zellen in der Milz, den mesenterialen Lymphknoten und in der Lamina propria nachweisen. Als Erklärung bieten THOMAS und PARROT an, daß sowohl immunogenes, als auch tolerogenes Antigen die Darmwand passieren, eine lokale Immunantwort zumindest im vorliegenden Fall nicht stattfindet, und die Leber die eigentlich die Immunogene sequestriert und so das Gleichgewicht Immunogene-Tolerogene zu Gunsten der Tolerogene verschiebt. Diese Hypothese, die die Bedeutung der Leber hervorhebt, wird gestützt durch Untersuchungen von CANTOR und DUMONT (10), die zeigten, daß die portocavale Transposition der Gefäße eine orale Toleranzinduktion verhindert. ANDRÉ und HEREMANS (1) fütterten Mäuse vier Tage lang mit Schaferythrozyten. Auch diese Tiere zeigten nach einer anschließenden intraperitonealen Gabe des Antigens nicht die erwarteten immunologischen Reaktionen. Aus dem Blut dieser Mäuse ließ sich ein wahrscheinlich aus IgA-Immunkomplexen bestehendes Tolerogen isolieren, das in der Lage war, die Produktion und Sekretion von Antikörpern durch bereits aktivierte B-Zellen in vitro zu hemmen. ANDRÉ und HEREMANS gehen deshalb davon aus, daß das vor allem in der Darmwand und im portalen lymphatischen Gewebe der Leber produzierte IgA mit dem enteral verabreichten Antigen Immunkomplexe bildet, und daß diese Immunkomplexe eben durch Paralyse der B-Zellen die Toleranz im Organismus induzieren.

Interessante Aspekte ergeben sich aus den Untersuchungen von HANSON et al (23,24,25,36). Mäuse, denen Ovalbumin einmalig enteral verabreicht worden war, entwickelten eine Hyposensibilität und reagierten nicht auf eine intraperitoneale Applikation des Antigens. Zuvor immunisierte Tiere hingegen reagierten auf die orale Gabe des Antigens mit einer sekundären Immunantwort. Die Reaktion dieser Tiere auf eine anschließende intraperitoneale Applikation von Ovalbumin war aber wiederum wesentlich geringer als bei solchen Mäusen, die zwar immunisiert, aber nicht gefüttert worden waren. Nicht vorbehandelte Mäuse, denen gleichzeitig zu einer enteralen Gabe von Ovalbumin parenteral Antikörper gegen Ovalbumin verabreicht worden waren, zeigten eine verminderte Toleranzentwicklung. In der gleichen Weise reagierten Tiere, die neben einer enteralen auch eine intraperitoneale Gabe von Ovalbumin erhalten hatten.

Ob ein Organismus nun Toleranz oder Immunität gegenüber einem Antigen entwickelt, scheint von einer ganzen Reihe unterschiedlicher Faktoren abzuhängen. Eine wichtige Rolle spielt die Dosis, in der das Antigen enteral verabreicht wird. Nach den Ergebnissen von ANDRÉ et al (3) führt eine einmalige enterale Applikation von 200 mg Humanserumalbumin bei Ratten zu einer Immunisierung, 25 mg Rinderserumalbumin, als Tagesdosis über einen längeren Zeitraum hinweg gegeben, erzeugen dagegen Toleranz (51). Ebenfalls von Bedeutung scheint zu sein, auf welche Weise der Organismus zum ersten Mal mit dem Antigen in Berührung kommt. Bereits immunisierte Tiere zeigen nach einer enteralen Applikation des Antigens immunologische Reaktionen im Sinne einer Sekundärantwort.

Umgekehrt können Tiere, denen das Antigen zuerst enteral verabreicht worden war, nur noch äußerst schlecht parenteral immunisiert werden (24). HANSON (24) geht aufgrund seiner Ergebnisse davon aus, daß sich Immunität und Toleranz unabhängig voneinander entwickeln. Dies könnte durch unterschiedliche Entstehungsmechanismen für Toleranz und Immunität oder durch Unterschiede in der Lokalisation des Primärkontakts mit dem Antigen oder durch eine Kombination beider Faktoren bedingt sein.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, daß sich die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente in wesentlichen Punkten von den meisten anderen Untersuchungen unterscheiden, die die Möglichkeit einer enteralen Toleranzinduktion behandeln. Die für die vorliegenden Versuche herangezogenen Kaninchen waren zuvor gegen das Antigen immunisiert worden, während andere Autoren in der Regel nicht vorbehandelte Versuchstiere verwendeten. Lediglich die von HANSON (23,24) durchgeführten, oben beschriebenen Versuche stellen eine Ausnahme dar. Ein weiterer Unterschied ist darin zu sehen, daß für die vorliegende Arbeit vor allem die kurzfristigen Änderungen der Immunitätslage, wenige Stunden nach der enteralen Antigenapplikation von Interesse waren, während die längerfristigen Auswirkungen dagegen nur in wenigen Fällen untersucht wurden.

4.3. Modelle zur Erklärung kurzfristig eintretender Änderungen der Immunitätslage bei immunisierten Versuchstieren nach enteraler Applikation des Antigens

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche lassen erkennen, daß die nach intravenöser Gabe eines Antigens auftretenden anaphylaktoiden Reaktionen durch eine vorangestellte enterale Applikation des gleichen Antigens abgeschwächt werden können. Dies wird in erster Linie durch die Ergebnisse der Blutdruckmessung verdeutlicht, aus denen hervorgeht, daß nach intravenöser Applikation des HGG die vorbehandelten Tiere einen weitaus geringeren Abfall des arteriellen Drucks zeigen als die Tiere der Kontrollgruppe. Der arterielle Druck kann insofern mit dem immunologischen Geschehen in Verbindung gebracht werden, als im vorliegenden Fall das Ausmaß der Kreislaufdestabilisierung die Stärke der im Organismus ablaufenden Immunreaktionen widerspiegelt.

Es stellt sich die Frage nach den Mechanismen, die diese Reaktionsweise bedingen. Ausgangspunkt für die Experimente war der Gedanke, Antikörper durch enteral zugeführte Haptene zu blockieren. Inwieweit die Haptenhemmung für das immunologische Geschehen von Bedeutung war, konnte, wie schon gesagt, durch

die Versuche nicht klar gezeigt werden, sie stellt also nach wie vor eine Möglichkeit dar, den Versuchsablauf zu erklären. Die vorhandenen Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, daß nicht die Haptenhemmung, sondern in erster Linie andere Mechanismen die Veränderungen der Immunitätslage bewirken.

4.3.1. Veränderungen der Anzahl freier spezifischer Antikörper im Serum, des Bluthistaminspiegels und des C_3-Komplementfaktors im Serum

Wie durch den Radioimmunoassay gezeigt werden konnte, kam es nach jeder der beiden oralen Gaben von humanem Gammaglobulin zu einem signifikanten Abfall der freien spezifischen Antikörper im Serum. Dies führte dazu, daß die Tiere der Versuchsgruppe vor der intravenösen Antigenapplikation einen Antikörpertiter von durchschnittlich 190 µg/ml besaßen, während die Kontrolltiere Werte von über 530 µg/ml aufwiesen. Der Unterschied ist von großer Bedeutung, denn im Nachhinein zeigte sich, daß Tiere mit einem hohen Ausgangstiter sehr heftig auf die intravenöse Antigenexposition reagierten, während Tiere mit niedrigen Werten nur geringe Reaktionen erkennen ließen. Der Verbleib der freien Antikörper nach enteraler Applikation des Antigens könnte durch die Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen in der Darmwand der Kaninchen erklärt werden. Diese Annahme wird gestützt durch Untersuchungen von SEIFERT, EBERLE und BRENDEL (49), die mit Hilfe isotopentechnischer Methoden nachweisen konnten, daß auf einen enteralen Antigenreiz hin Antikörper in die Darmwand einwandern und dort Antigen-Antikörperkomplexe bilden, die anschließend in das Darmlumen weitertransportiert werden. Das Ausmaß der Einwanderung von Antikörpern in die Darmwand wird aus Abb.10 ersichtlich.

Nach der intravenösen Antigenapplikation steigt die Konzentration der frei im Serum zirkulierenden Antikörper sofort wieder an. Ob dieser Anstieg nun durch eine beschleunigte Neubildung oder einfach durch eine Umverteilung bereits vorhandener Antikörper hervorgerufen wird, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden. Im ganzen betrachtet entsteht aber der Eindruck,

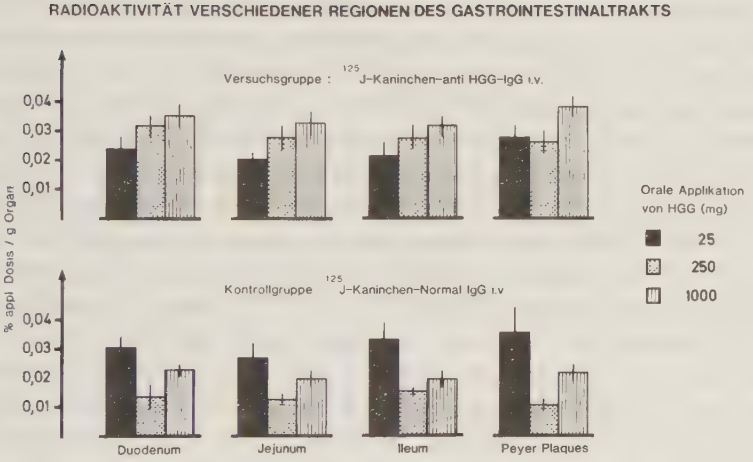

Abb. 10 Einwanderung 125-Jod markierter Antikörper aus dem Serum in die Darmwand als Reaktion auf eine enterale Antigenapplikation (Aus: B. Eberle, Mechanismen der Immunmanipulation durch enterale Antigenzufuhr. Diss. Lud.-Max. Univ. München 1982)

daß die humorale Abwehr in der Lage ist, eine Affinität zu Orten mit hoher Antigenkonzentration zu entwickeln.

Neben der Konzentration der frei im Serum zirkulierenden Antikörper wurden als weitere Parameter für die in den Kaninchen ablaufenden immunologischen Reaktionen der Bluthistaminspiegel und die Konzentration des C_3-Komplementfaktors im Serum bestimmt. Nach enteraler Antigenapplikation kommt es sowohl zu einem Anstieg des Histamins, als auch des Komplements (Abb. 5 und 6).
Dieser Anstieg könnte durch eine vermehrte Produktion beider Faktoren, als Ausdruck einer Abwehrreaktion des Organismus auf den Antigenreiz hin erklärt werden. Denkbar wäre aber auch, daß durch die enterale Antigenapplikation und die damit verbundenen immunologischen Veränderungen im Organismus die normalerweise ständig ablaufenden Reaktionen beider Faktoren im Sinne einer Toleranzinduktion gehemmt werden. Der Abfall der Konzentration sowohl des Histamins im Blut, als auch des C_3-Komplementfaktors im Serum nach intravenöser Gabe des Antigens ist Ausdruck der daraufhin ablaufenden Antigen-Antikörperreaktionen und ein erwartetes Ergebnis.

An dieser Stelle soll noch einmal betont werden, daß die durch die enterale Applikation des Antigens hervorgerufene Reduzierung freier spezifischer Antikörper im Serum eine mögliche Erklärung für die herabgesetzte Reaktionsbereitschaft des Organismus darstellt.

4.3.2. Veränderungen in den Peyerschen Plaques nach enteraler Antigenapplikation

Eine ganze Reihe von Autoren vertritt die Ansicht, daß den Peyerschen Plaques die entscheidende Rolle in der Vermittlung einer enteral induzierten Toleranz zufällt. Diesbezüglich dürfte vor allem die Entdeckung von Suppressor B- und T-Zellen in den Plaques von großer Bedeutung sein. NGAN und KIND (37) konnten in den Peyerschen Plaques von Mäusen, die zuvor zwei Wochen lang mit Ovalbumin gefüttert worden waren, Suppressor T-Zellen nachweisen. Diese Zellen waren spezifisch für Ovalbumin und

gegen die Bildung von IgE und IgG gerichtet. Sie besaßen außerdem eine größere hemmende Wirkung als die Suppressorzellen, die sich in der Milz befanden, was NGAN und KIND zu der Folgerung veranlaßte, daß möglicherweise die in der Milz vorhandenen Suppressor T-Zellen ursprünglich aus den Peyerschen Plaques stammen. ASHERSON et al (5) gelang der Nachweis von Suppressor B-Zellen in den Peyerschen Plaques von Mäusen, die zuvor mit Picrylchlorid gefüttert worden waren. Diese Zellen hatten die Fähigkeit, den passiven Transfer von Kontaktsensibilität zu unterdrücken. Im Rahmen dieser Arbeit kann keine Aussage darüber gemacht werden, in welchem Maße diese Zellen für die bei den Tieren der Versuchsgruppe beobachteten Veränderungen der Immunitätslage verantwortlich sind.

Anhand der histologischen Untersuchungen wird jedoch deutlich, daß die Peyerschen Plaques bereits immunisierter Tiere sehr heftig auf eine enterale Antigenzufuhr reagieren. Die Reaktionen, die sich hauptsächlich in Form einer massiven lymphozytären Infiltration der Plaques zu erkennen geben, sind jedoch schwer zu interpretieren. Histologische Präparate stellen immer eine morphologische Momentaufnahme dar und lassen nur in begrenztem Maße eine Aussage über den funktionellen Ablauf zu. Inwieweit in einer bestimmten Zeiteinheit lymphoide Zellen in die Peyerschen Plaques eindringen und diese dann auch wieder verlassen, in welchem Maße die enterale Antigenapplikation zu einer Neubildung von Zellen führt und welche Funktionen dabei festgelegt oder Informationen ausgetauscht und erhalten werden, kann anhand der vorliegenden Untersuchungen nicht beurteilt werden.

Daß die Zellen in den Peyerschen Plaques sehr vielseitige Funktionen haben, geht auch aus den Experimenten von CRAIG und CEBRA (15) und RUDZIK et al (43) hervor, die zeigen konnten, daß die enterale Applikation von Antigen eine Stimulation von IgA-Vorläuferzellen in den Peyerschen Plaques bewirkt, was dann im weiteren Verlauf eine Proliferation und die Entstehung IgA-produzierender Plasmazellen in der Lamina propria zur Folge hat. KAGNOFF und CAMPBELL (31) sind der Ansicht, daß enteral induzierte Toleranz durch einen Mangel sogenannter

'adherent accessory cells' in den Peyerschen Plaques hervorgerufen wird. Diese Aussage steht im Einklang mit Ergebnissen von CINADER und FUJIWARA (13) und COWING et al (14), die zeigen konnten, daß die Aktivität solcher 'adherent accessory cells' als Ursache für die Resistenz bestimmter Mäusestämme gegenüber einer enteralen Toleranzinduktion anzusehen ist. Da es sich bei den 'adherent accessory cells' um Makrophagen handeln könnte, gewinnt auch die 1963 von FISHMAN und ADLER (21) aufgestellte Theorie neues Interesse, nach der den Makrophagen eine bedeutende Mittlerrolle im Ablauf der Immunantwort zufällt, indem sie das Antigen in eine aktive Form überführen. Dieses aktivierte Antigen soll seinerseits die immunkompetenten Zellen stimulieren. Entfällt die Aktivierung durch die Makrophagen, so werden durch das Antigen zwar Rezeptorstellen an den immunkompetenten Zellen belegt, es kommt aber nicht zu einer Stimulation mit nachfolgender Immunantwort. Dies hätte dann eine Toleranz des Organismus gegenüber dem Antigen zur Folge.

Ein besonderer Aspekt ergibt sich aus dem Nachweis sekretorisch tätiger Plasmazellen in den Peyerschen Plaques oral vorbehandelter Kaninchen. Dies scheint nach eingehendem Literaturstudium das erste Mal zu sein, daß sezernierende Plasmazellen in den Plaques beobachtet wurden. Der Befund unterstützt die Aussage von CRAIG und CEBRA (15) und RUDZIG et al (43), daß die in der Lamina propria auffindbaren Plasmazellen ihren Ursprung in den Peyerschen Plaques nehmen. Der Nachweis sekretorischer Plasmazellen scheint vor allem deswegen von Bedeutung, weil dadurch gezeigt werden kann, daß die Versuchstiere als Reaktion auf die enterale Applikation des Antigens Antikörper im Magen-Darmtrakt produzieren. Wenn man berücksichtigt, daß in Kaninchen ca. 80 % aller Immunglobulin produzierenden Zellen im Dünndarm IgA herstellen, so ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, daß die in den Peyerschen Plaques gefundenen Plasmazellen ebenfalls diese Sorte von Antikörpern produzieren. In diesem Zusammenhang dürften auch die Untersuchungen von NGAN und KIND (37) von Interesse sein, die in den Peyerschen Plaques von Mäusen nach enteraler Applikation von Ovalbumin zwar Suppressor T-Zellen für IgE und IgG fanden, Suppressor T-Zellen für IgA

aber nicht nachweisen konnten. Insgesamt gesehen scheint IgA eine außergewöhnliche Rolle im immunologischen Geschehen des Magen-Darmtrakts zu spielen. Es wäre sogar denkbar, daß dieses Immunglobulin für die Vermittlung einer enteral induzierten Toleranz von entscheidender Bedeutung ist. An dieser Stelle sei nochmals an die Untersuchungen von ANDRÉ et al (1) erinnert, die nach enteraler Toleranzinduktion in dem Blut von Mäusen ein wahrscheinlich aus IgA-Immunkomplexen bestehendes Tolerogen fanden, das in der Lage war, die Produktion und Sekretion von Antikörpern durch bereits aktivierte B-Zellen in vitro zu hemmen. Der Nachweis sekretorisch aktiver Plasmazellen in den Peyerschen Plaques der Kaninchen läßt es möglich erscheinen, daß auch bei den vorgelegten Versuchen tolerogen wirkende Immunkomplexe bestehend aus IgA und enteral verabreichtem Antigen entstanden sind, die dann im weiteren über eine Paralyse der B-Zellen die Toleranz im Organismus induzierten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, daß die Abschwächung der Immunitätslage nach einer enteralen Applikation des Antigens durch eine ganze Reihe zum Teil sehr unterschiedlicher Mechanismen erklärt werden kann. Inwieweit die immunologischen Veränderungen nun hauptsächlich durch den Mechanismus der Haptenhemmung, den Abzug freier spezifischer Antikörper aus dem Serum, die Bildung von Suppressorzellen oder das Entstehen tolerogen wirkender Immunkomplexe hervorgerufen werden, läßt sich anhand der vorliegenden Untersuchungen nicht genau beantworten.

Unabhängig von der Frage, welcher der oben aufgeführten Mechanismen nun letztendlich die ausschlaggebende Rolle spielt, steht jedoch fest, daß durch die enterale Applikation eines Antigens Toleranz erzeugt werden kann. Lassen sich die im Tierexperiment gemachten Erfahrungen auf den Menschen übertragen, so könnte es in der Zukunft möglich sein, auf diese Weise den Ablauf antikörperinduzierter Erkrankungen positiv zu beeinflussen.

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, den Fragen nachzugehen, inwieweit durch die enterale Applikation eines gespaltenen Antigens kurzfristig in einem bereits sensibilisierten Organismus Toleranz gegen eine nachfolgende parenterale Antigenexposition erzeugt werden kann und welche Mechanismen gegebenenfalls für diese Toleranzinduktion verantwortlich zu machen sind.

Parenteral gegen humanes Gammaglobulin (HGG) immunisierte Kaninchen wurden nach dem Nachweis präzipitierender Antikörper in eine Kontrollgruppe und eine sogenannte Versuchsgruppe aufgeteilt und einer intravenösen Applikation des Antigens ausgesetzt. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren erhielten die Tiere der Versuchsgruppe 4 und 2 Stunden vor der intravenösen Antigenapplikation eine orale Gabe von jeweils 500 mg pepsingespaltenem humanem Gammaglobulin. Gemessen wurden Veränderungen des arteriellen Drucks, die Organdurchblutung, sowie für das immunologische Geschehen bedeutsame Faktoren. Außerdem erfolgte eine histologische Untersuchung der Peyerschen Plaques.

Die Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Innerhalb einer Stunde nach der intravenösen Antigenapplikation starben 23 % der Kontrolltiere und 8 % der Tiere der Versuchsgruppe.
2. Die intravenöse Antigenapplikation führte bei den Tieren der Versuchsgruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einem signifikant geringeren Blutdruckabfall.
3. Die Durchblutungsmessungen ließen die Tendenz erkennen, daß enteral vorbehandelte Kaninchen nach intravenöser Antigenapplikation eine gegenüber Kontrolltieren vermehrte Organdurchblutung aufweisen.
4. Die enterale Applikation von HGG führte zu einem signifikanten Abfall der Zahl freier HGG-spezifischer Antikörper im Serum. Unmittelbar vor der intravenösen Gabe des Antigens betrug der Antikörpertiter der Kontrolltiere 530 µg/ml, der der Tiere der Versuchsgruppe nur 190 µg/ml.

Nach der intravenösen Antigenapplikation kam es in beiden Gruppen zu einem nicht signifikanten Anstieg der Zahl freier spezifischer Antikörper.

5. Die enterale Applikation von humanem Gammaglobulin führte zu einem signifikanten Anstieg sowohl des Bluthistaminspiegels als auch des C_3-Komplementfaktors im Serum. Die nachfolgende intravenöse Antigenexposition bewirkte einen signifikanten Abfall beider Werte.
6. Bei den Tieren der Versuchsgruppe führte die enterale Applikation von humanem Gammaglobulin zu einer massiven Infiltration der Peyerschen Plaques mit lymphoiden Zellen. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten in den Follikeln derart veränderter Plaques Plasmazellen nachgewiesen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten, daß antikörperbedingte anaphylaktoide Reaktionen des Organismus als Folge einer intravenösen Gabe von humanem Gammaglobulin durch die vorherige enterale Applikation des Antigens verhindert werden können. Die Blockierung freier spezifischer Antikörper durch Haptene, ein Abzug freier spezifischer Antikörper aus dem Serum, die Bildung von Suppressorzellen und das Entstehen tolerogen wirkender Immunkomplexe stellen mögliche Mechanismen für die in den vorliegenden Untersuchungen aufgetretenen Veränderungen der Immunitätslage dar.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ANDRÉ, C., J.F. HEREMANS, J.P. VAERMAN and C.I. CAMBIASO
A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: antigen-antibody complexes
J.Exp.Med. 142, 1509 - 1519 (1975)

2. ANDRÉ, C., J. KLINOWSKA et C. FARGIER
Relation entre tolérance immunitaire induite par voie digestive et réponse immune locale
Ann. Immunol. 1290, 881 - 885 (1975)

3. ANDRÉ, C., R. LAMBERT, H. BAZIN and J.F. HEREMANS
Interference of oral immunization with the intestinal absorption of heterologous albumin
Eur. J. Immunol. 4, 701 - 704 (1974)

4. ARCHIBALD, L.H., F. MOODY and M. SIMONS
Measurement of gastric blood-flow with radioactive microsperes
J. Appl. Physiol. 38, 1051 - 1056 (1975)

5. ASHERSON, G.L., ZEMBALA, M., PERERA, M.A.C.C., MAYHEW, B. and W.R. THOMAS
Production of immunity and unresponsiveness in the mouse by feeding contact sensitizing agents and the role of suppressor cells in the peyer's patches, mesenteric lymph nodes and other lymphoid tissues.
Cell. Immunol. 33, 145 - 155 (1977)

6. AUERBACH, R. and J. ROETHLE
Tolerance to heterologous erythrocytes
Science, 183, 332 - 333 (1974)

7. BATTISTO, J.R. and J. MILLER
Immunological unresponsiveness produced in adult guinea pigs by parenteral introduction of minute quantities of hapten or protein antigen.
Proc. Soc. Exp. Biol. 111, 111 (1962)

8. BIRO, C.E. and G. GARCIA
The antigenicity of aggregate and aggregate-free human gamma globulin for rabbits
Immunol. 8, 411 - 419 (1965)

9. BRENDEL, W., W. LAND, U. HOPF and J. SEIFERT
Induction of tolerance in man to horse IgG
Lancet II, 1141 (1969)

10. CANTOR, H.M. and A.E. DUMONT
Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system
Nature, 215, 711 (1967)

11. CHALLACOMBO, S.J. and T.B. TOMASI, jr.
Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization
J. Exp. Med. 152, 1459 - 1471 (1980)

12. CHASE, M.W.
Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent
Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 61, 257 (1946)

13. CINADER, B. and M. FUJIWARA
The role of accessory and thymus derived cells in resistance to tolerance induction. In: Immunological Tolerance, Edited by D.H. Katz and B. Benacerraf, Academic Press, New York, p. 67 (1974)

14. COWING, C., M. LUKIC and S. LESKOWITZ
The cellular basis for establishing tolerance or immunity to bovine y-globulin in mice. In: Immunological Tolerance, Edited by D.H. Katz and B. Benacerraf, Academic Press, New York, p. 61 (1974)

15. CRAIG, S.W. and J.J. CEBRA
Peyer's Patches: an enriched source of precursors for IgA producing immunocytes in the rabbit
J. Exp. Med. 134, 188 - 200 (1971)

16. DAVIS-MILLER, M. and R.L. BRATCHER
Alteres humoral immune response to sheep red blood cells by sheep erythrocyte soluble hemolysate
J. Immunol. 119, 1115 - 1121 (1977)

17. DE WECK, A.L. and C.H. SCHNEIDER
Specific inhibition of allergic reactions to penicillin in man by a monovalent hapten 1. Experimental, immunological and toxicologic studies
Int. Arch. Allergy: 42, 782 - 797 (1972)

18. DE WECK, A.L. and J.P. GIRARD
Specific inhibition of allergic reactions to penicillin in man by a monovalent hapten 2. Clinical studies
Int. Arch. Allergy 42, 798 - 815 (1972)

19. ENDERS, G., J. SEIFERT, H. LIEBICH, A. HAUFFE and W. BRENDEL
The role of the peyer's patches as defense system ot the gut
Eur. Surg. Res. 13, 39 (1981)

20. FIGACZ, G.
Immunantwort und Kreislaufreaktion bei Kaninchen nach oraler Applikation von menschlichem Gammaglobulin
Dissertation, München 1981

21. FISHMAN, M. and F.L. ADLER
Antibody formation initiated in vitro. II. Antibody synthesis in X-irradiated recipients of diffusion chambers containing nucleic acid derived from macrophages incubated with antigen.
J. Exp. Med. 117, 595 (1963)

22. FRANKS, J.J., V. TAKEDA and E.B. REEVE
Preparation of autologous J-131-albumin for metabolic studies in man
J. Lab. Clin. Med. 60, 619 - 628 (1962)

23. HANSON, D.G., N.M. VAZ, L.C.S. MAIA, M.M. HORNBROOK, J.M. LYNCH and C.A. ROY
Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens
Int. Arch. Allergy appl. Immun. 55, 526 - 532 (1977)

24. HANSON, D.G., N.M. VAZ, L.C.S. MAIA and J.M. LYNCH

Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. II. Effects of prior passive and active immunization
J. Immunol. 122, 2261 - 2266 (1979)

25. HANSON, D.G., N.M. VAZ, L.C.S. MAIA and J.M. LYNCH

Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. III. Evidence against maintenance of tolerance to ovalbumin by orally-induced antibodies
J. Immunol. 123, 2337 (1979)

26. KAGNOFF, M.F.

Effects of antigen-feeding on intestinal and systemic immune responses. I. Priming of precursor cytotoxic T cells by antigen feeding
J. Immunol. 120, 395 - 399 (1978)

27. KAGNOFF, M.F.

Effects of antigen-feeding on intestinal and systemic immune responses. II. Suppression of delayed-type hypersensitivity reactions
J. Immunol. 120, 1509 - 1513 (1978)

28. KAGNOFF, M.F.

Effects of antigen-feeding on intestinal and systemic immune responses. III. Antigen specific serum-mediated suppression of humoral antibody responses after antigen feeding.
Cell. Immunol. 40, 186 - 203 (1978)

29. KAGNOFF, M.F. Functional characteristics of peyer's patch lymphoid cells. III. Carrier priming of T cells by antigen feeding. J. Exp. Med. 142, 1425 - 1435 (1975)

30. KAGNOFF, M.F. Functional characteristics of peyer's patch lymphoid cells. IV. Effect of antigen feeding on the frequancy of antigen specific B cells. J. Immunol. 118, 992 - 997 (1977)

31. KAGNOFF, M.F. and S. CAMPBELL Functional characteristics of peyer's patch lymphoid cells. I. Induction of humoral antibody and cell mediated allograft reactions J. Exp. Med. 139, 398 - 406 (1974)

32. LAUBENTHAL, H., K. PETER, H. HEDIN, W. RICHTER and K. MESSMER Specific hapten inhibition for prevention of dextran induces anaphylactoid reactions. Clinical results. Europ. Surg. Res. 12, Suppl. 1 68 (1980)

33. MATTINGLY, J.A. and B.H. WAKSMAN Immunologic suppression after oral administration of antigen I. Specific suppressor cells formed in rat peyer's patches after oral administration of sheep erythrocytes and their systemic migration. J. Immunol. 121, 1878 - 1883 (1978)

34. MESSMER, K., K.G. LJUNGSTRÖM, U.F. GRUBER, W. RICHTER und H. HEDIN
Prevention of dextran-induced anaphylactoid reactions by hapten inhibition.
Lancet 1, 975 (1980)

35. MESSMER, K., C. SEEMANN, W. RICHTER, H. HEDIN and H. LAUBENTHAL
Anaphylaktoide Reaktionen nach Dextran: II. Tierexperimentelle Untersuchungen zum Prinzip der Haptenhemmung.
Beiträge zur Infusionstherapie 8, 66 (1981)

36. MILLER, S.D. and D.G. HANSON
Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens.
IV. Evidence for tolerance and specific active suppression of cell mediated immune responses to ovalbumin.
J. Immunol. 123, 2344 - 2350 (1979)

37. NGAN, J. and L.S. KIND
Suppressor T cells for IgE and IgG in peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin.
J. Immunology 120, 861 - 865 (1978)

38. OUCHTERLONY, Ö.
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II.
Progr. Allergy 6, 30 (1962)

39. RICHMAN, L.K., J.M. CHILLER, W.R. BROWN, D.G. HANSON and N.M. VAZ
Enterally induced immunologic tolerance.
I. Induction of suppressor T lymphocytes by intra gastric administration of soluble proteins.
J. Immunol. 121, 2429 - 2434 (1978)

40. RICHTER, W.
Built-in hapten inhibition of anaphylaxis by the low molecular weight subfractions of a B-512 dextran fraction of MW 3400.
Int. Arch. Allergy 45, 930 (1973)

41. RICHTER, W., H. HEDIN, D. KRAFT and K. MESSMER
Anaphylaktoide Reaktionen nach Dextran: I. Immunologie des Pathomechanismus und der Haptenprophylaxe.
Beiträge zur Infusionstherapie 8, 54 (1981)

42. RUDOLPH, A.M. and M.A. HEYMANN
The circulation of the fetus in utero.
Circ. Res. 21, 163 (1967)

43. RUDZIK, R., R.L. CLANCY, D.Y.E. PEREY, R.P. DAY and J. BIENENSTOCK
Repopulation with IgA-containing cells of bronchial and intestinal lamina propria after transfer of homologous peyer's patch and bronchial lymphocytes.
J. Immunol. 114, 1599 - 1604 (1975)

44. SEIFERT, J., J. RING and W. BRENDEL — The absorption of ALG from the gut and its lymphocytopenic effects in dogs. Europ. Surg. Res. 6 Suppl. 1, 44 (1974)

45. SEIFERT, J. — Fremdproteine in Blut und Lymphe nach oraler Applikation. Fortschr. Med. 93, 1557 - 1560 (1975)

46. SEIFERT, J. — Enterale Resorption großmolekularer Proteine bei Tieren und Menschen Z. Ernährungswiss. Suppl. 18 1, (1976)

47. SEIFERT, J., B. EBERLE and W. BRENDEL — Reduction of circulating antibodies by antigen feeding. Immunbiol. 157, (1980)

48. SEIFERT, J., B. EBERLE and W. BRENDEL — Fixation of circulating antibodies in the gut by enterally applied antigen. Hepato-Gastroenterology Thieme, Stuttgart 1980

49. SEIFERT, J., B. EBERLE, K. HALLFELDT, G. FIGACZ, J. RING and H. LIEBICH — Microcirculation in the gut and absorption of protein antigens in correlation with the immune response. Eur. Surg. Res. 12, 226 (1980)

50. SEIFERT, J., B. EBERLE, J. KRUMBACH and H. LIEBICH
Adaptive mechanisms in the small intestine to enterally applied antigen.
In: R. Robinson (Hrsg.): 'Intestinal adaptions and its mechanisms'
MTP Press Ltd., Lancaster 1982

51. THOMAS, H.C. and D.M.V. PARROT
The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration.
Immunology 27, 631 - 639 (1974)

52. WALKER, W.A., K.J. ISSELBACHER and K.J. BLOCH
Intestinal uptake of macromolecules.
I. Effect of oral immunization
Science 177, 608 - 610 (1972)

53. WALKER, W.A., K.J. ISSELBACHER and K.J. BLOCH
Intestinal uptake of macromolecules.
II. Effect of parenteral immunization.
J. Immunol. 111, 221 - 226 (1973)

54. WALKER, W.A., M. WU, K.J. BLOCH and K.J. ISSELBACHER
Intestinal uptake of macromolecules.
III. Studies on the mechanism by which immunization interferes with antigen uptake.
J. Immunol. 115, 854 - 861 (1975)

55. WALZER, M. Studies in absorption of undigested proteins in human beings. J. Immunol. 14, 143 (1927)

56. WEIGLE, W.O. Immunological unresponsiveness Adv. Immunol. 16, 61 - 118 (1973)

57. WELLS, H.G. and T.B. OSBORNE The biological reactions of the vegetable proteins. J. Infect. Dis. 8, 66 - 124 (1911)

58. WELLS, H.G. Studies on the chemistry of anaphylaxis. Experiments with isolated proteins, especially those of the hen's egg. J. Infect. Dis. 9, 147 (1911)